

데옥시콜릭산에 의한 HT-29 대장상피세포의 신호전달 -NF- κ B와 Interleukin-8의 역할-

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 이화여자대학교 생명과학부*

이동기 · 박선영 · 백순구 · 권상옥 · 정준모* · 오억수* · 김현수

Deoxycholic Acid-Induced Signal Transduction in HT-29 Cells: Role of NF- κ B and Interleukin-8

Dong Ki Lee, M.D., Sun Young Park, Soon Koo Baik, M.D., Sang Ok Kwon, M.D.,
Jun Mo Chung, Ph.D.*, Eok-Soo Oh, Ph.D.*, and Hyun Soo Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju;
Department of Life Science, Ewha Women's University*, Seoul, Korea

Background/Aims: Deoxycholic acid (DCA) has been appeared to be an endogenous colon tumor promoter. In this study, we investigated whether DCA induces nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation and IL-8 expression, and tauroursodeoxycholic acid (TUDC) inhibits this signaling in HT-29 cells. **Methods:** After DCA treatments, time courses of NF- κ B binding activity were determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Also, we performed Western blotting of I κ B α to confirm NF- κ B activation. Time and concentration courses of DCA-induced secretion of IL-8 were measured with ELISA in supernatants of cultured media from the cells. To evaluate the role of NF- κ B, IL-8 levels were assessed after pretreatment with using phosphorothioate-modified anti-sense oligonucleotides (ODN). Moreover, DCA-induced secretions of IL-8 were measured after pretreatment with TUDC. **Results:** DCA dose-dependently induced prominent NF- κ B binding complexes from 30 min to 8 hr and degradation of I κ B α . The secretions of IL-8 were increased with DCA (50~200 μ M) treatment in a time and dose-dependent manner. Pre-incubation of the cells with TUDC (0.1~10 μ M) for 2 hours caused significant decreases in DCA induced IL-8 secretion. However, transient transfection using p50 or p65 AS-ODN showed no effect on IL-8 secretion. **Conclusions:** DCA may play as a colonic tumor promoter through anti-apoptotic effect of NF- κ B activation and IL-8 expression, and DCA-induced NF- κ B independent IL-8 expression is inhibited by TUDC. (Korean J Gastroenterol 2004;43:176-185)

Key Words: Deoxycholic acid; HT-29 cells; NF- κ B; Interleukin-8

서 론

대장암의 발생 과정에는 다양한 유전자의 결함과 더불어 고지방식이와 같은 환경적인 요소가 관여한다. 역학 연

접수: 2003년 10월 24일, 승인: 2004년 2월 14일
연락처: 김현수, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162
원주기독병원 소화기내과
Tel: (033) 741-1229, Fax: (033) 745-6782
E-mail: hskim@wonju.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 연세학술연구비 지원에 의해 이루어짐.

Correspondence to: Hyun Soo Kim, M.D., Ph.D.
Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College
of Medicine, Wonju Christian Hospital
162 Ilsan-dong Wonju 220-701, Korea
Tel: +82-33-741-1229, Fax: +82-33-745-6782
E-mail: hskim@wonju.yonsei.ac.kr

구에 따르면 고지방식이 후 증가하는 대변내 담즙산은 대장암의 위험도를 증가시킨다.¹ 고지방식이를 하는 서양인에서 동양인보다 대변내 담즙산 농도가 증가하고 대장암 발생률이 높다²는 사실과 대장암의 전구 병변인 선종이 있는 환자에서 대변내 담즙산의 농도가 정상인에 비해 높다³는 연구 결과는 이를 뒷받침한다.

고지방식이는 지방의 소화와 흡수에 필요한 담즙산의 간내 생성과 장으로의 분비를 증가시켜 대변 내에 담즙산의 농도를 증가시킨다. 장관 내로 분비된 담즙산은 장내 세균에 의하여 데옥시콜릭산(DCA; deoxycholic acid)이 주성분인 2차 담즙산으로 대사되며⁴ 이는 대장 상피세포에 강한 독성을 나타내 대장 상피세포의 세포자멸사를 촉진하고 이차적 변화로 세포증식을 촉진한다.⁵ 따라서 DCA에 의한 대장 상피세포의 증식과정에서 유전적 손상과 발암물질에 대한 감수성이 높아짐으로써 암 발생이 증가한다.⁶ 최근 연구에 의하면 대장암의 발생은 이러한 세포고사에 저항성을 가진 세포들의 선별증식과 연관된다.⁷ 또한 동물모델에서 DCA는 직접적인 암 발생물질이라기보다는 발암물질에 의한 대장종양 발생을 촉진시키는 종양 촉진인자로 작용한다.⁸ 하지만 DCA와 같은 소수성 이차 담즙산이 대장암의 종양형성을 촉진하는 기전과 이를 매개하는 신호전달 경로는 정확히 알려져 있지 않다.

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 면역과 염증반응을 조절하는 전사조절인자로서 세포증식이나 변형과 관련되는 세포신호를 전달한다. 대장암 세포주에서 NF- κ B가 활성화되면 세포자멸사를 억제하여 항암제에 대한 저항성을 높인다는 사실^{9,10}과 대장 선종이나 대장암 조직에서 NF- κ B의 활성도가 증가한다는 연구 결과^{11,12}는 NF- κ B의 활성화가 대장 종양의 생존 신호전달 경로를 활성화시켜 대장암의 발생에 관여함을 시사한다. 또한 대표적인 친염증성 사이토카인으로 잘 알려진 Interleukin-8 (IL-8)은 최근 다양한 고형암의 전이과정에서 발현이 증가하며 혈관형성을 촉진시키는 혈관촉진전구인자로 밝혀지고 있다.^{13,14} 대장암 세포주에서 IL-8과 IL-8수용체가 과발현되면 혈관형성이 증가하며 암의 전이와 강한 상관관계를 보이고¹³ 간 전이를 동반하는 대장암 환자에서 간 전이가 없는 환자에 비하여 혈청 내 IL-8의 농도가 높다는 사실¹⁴은 대장암의 전이에 IL-8이 중요한 역할을 함을 의미한다.

따라서 본 연구는 HT-29 대장암 세포주를 이용하여 데옥시콜릭산 투여 후 NF- κ B의 활성화 여부와 IL-8 발현의 변화를 알아보고 IL-8의 발현이 전사조절인자인 NF- κ B에 의하여 조절되는 지를 알아보고자 하였다. 또한 대장암의 화학예방약물로 잘 알려진 타우로우르소데옥시콜릭산(TUDC; tauroursodeoxycholic acid)을 전처리 한 후 IL-8 발현의 억제 여부를 평가하여 데옥시콜릭산에 의한 세포신호

전달을 차단하는 지를 동시에 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주, 시약 및 항체의 구입

인체에서 기원한 대장암 세포주인 HT-29 세포주를 한국 세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 분양받아 10% 우태아 혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 항생제(페니실린 100 U/mL와 스트렙토마이신 100 μ g/mL)가 함유된 RPMI-1640 배지(pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% 이산화탄소 농도의 배양 조건을 유지하였다. 본 연구에서 사용하는 담즙산인 DCA와 타우로우르소데옥시콜릭산(TUDC; tauroursodeoxycholic acid)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 T4 polynucleotide는 Gibco (Grand island, NY, USA)에서 구입하였다. I κ B α 항체, NF- κ B p65-항체, NF- κ B p50-항체는 Santa Cruz사(CA, USA), NF- κ B oligonucleotide는 Promega (Madison, WI, USA), [³²P] dATP, Poly (dI-dC)는 Amersham (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. Quick spin column은 Beringer-mannheim (Indianapolis, IN, USA), IL-8 항체는 R&D (Minneapolis, MN, USA) 제품을 구입하였다.

2. 약물의 처리

HT-29 세포주는 10 cm petri dish에서 배양한 후 1%의 trypsin으로 떼어낸 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리한 HT-29 세포를 24-well dish에 재분주(3~5 $\times 10^5$ 개/mL)하여 10% 열 불활성화 우태아 혈청이 포함된 RPMI-1640 배지에서 24시간 배양한 후 3회 배지를 갈아 혈청을 제거하였다. 데옥시콜릭산은 최종 농도의 1/50로 RPMI-1640 배지에 희석하여 준비한 후에 10 μ L씩 24-well에 첨가하여 주었다. 데옥시콜릭산은 DMSO에 0.1 M로 녹인 후 20°C에 두고 실험 때마다 사용하였다.

3. DCA 처리 후 세포의 생존율과 증식능의 측정

담즙산 자극 전후 HT-29 세포주와 Caco-2 세포주에서 세포의 생존능은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay와 thymidine incorporation assay를 통하여 정량적으로 측정하였다. 배양된 세포를 수거하여 trypan blue를 처리한 뒤 용적당 세포 수를 계산하여 96 well-plate에 1×10^4 /mL 세포를 분주하여 70~80% 융합 상태의 단층세포가 되도록 24시간 배양하였다. DCA를 세포 배양액에 용해시켜 혈청이 없는 배지에 희석하여 2 μ L의 pore size에 여과시키고 각각의 농도로 96 well-plate에 첨가

하였다. 시간에 따라 대조군과 DCA 처리한 well의 세포배양액을 버리고 20 μ L의 MTT를 96 well-plate에 첨가하고 37°C에서 5~6시간 배양 후에 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 50% *N,N*-dimethyl-formamide가 함유된 75 μ L의 lysate buffering solution을 각 well에 첨가하여 37°C에서 overnight하였다. 2~3시간 동안 96 well-plate를 잘 혼합하여 570 nm 파장에서 발광도를 ELISA 판독기(Molecular Devices, Menlo Park, CA)로 정량적으로 측정하였다. Thymidine incorporation assay는 96 well-plate에 각 조건에 맞게 well당 1 μ Ci의 [3 H]-thymidine (Life science, Boston, MA, USA)을 넣은 뒤 37°C, 10% 이산화탄소 배양기에서 1~2시간 배양한 후 세포 수집기(Harvester)를 이용하여 각 샘플을 여과지에 부착시키고 여과지를 cocktail solution (Beckman, San Francisco, CA, USA)과 섞은 후에 liquid scintillation counter (Beckman)을 이용하여 측정하였다.

4. DCA 자극 후 I κ B α 의 Western Blot

HT-29 세포주에 데옥시콜릭산을 농도별(0~400 M)과 시간별로 투여한 후 PBS용액으로 세 번 씻어 용해 buffer액 {150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl-sulfate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mg/mL leupeptin, 2 mg/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)} 500 μ L에 처리하였다. 플라스틱 scraper로 세포를 모아 얼음 위에서 30분간 배양한 후 4°C 14,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액에서 Bradford 방법¹⁵을 이용하여 단백질을 정량하였다. 추출된 단백질(100 μ g)은 15% SDS-polyacrylamide 겔에 전기영동한 후, 겔을 nitrocellulose membrane (BIO-RAD, 0.2 μ m pore size)에 blotting하였다. 막에 I κ B α 항체(Santa Cruz)와 이차 항체(Santa Cruz)로 합성시킨 후, enhanced chemical luminescence (ECL; Amersham, Piscataway) 방법을 이용하여 X-ray 필름에 membrane을 노출시켜 band를 얻었다. 동량의 단백질이 부하되었는지는 α -tubulin 항체(Sigma)를 통하여 비교하였다.

5. 핵단백의 추출과 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

HT-29 세포에서의 핵단백질 추출은 Schreiber 등¹⁶의 방법을 이용하였다. 각각의 조건으로 처리한 세포들은 4°C 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 수집하였다. 400 L의 buffer A (10 mM HEPES; pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, 80 μ g benzamidine/mL)를 첨가하고 얼음 위에서 30분 경과 후 Nonidet P-40 (최종 농도 0.1%)을 처리하여 10초간 잘 섞어 주었다. 혼합물은

4°C 14,000 rpm에서 10분간 원심분리를 한 뒤 상층액은 버리고 남아 있는 침전물에 20 μ L의 buffer C (20 mM HEPES; pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, 80 g benzamidine/mL)을 첨가한 후, 10초간 강하게 혼합한 뒤 4°C 14,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 1.5 mL 튜브에 상층액을 옮겨 담은 후 단백질 정량은 Bradford¹⁵ 방법으로 측정하였다.

NF- κ B 결합 부위의 염기서열을 가진 oligonucleotide (ODN) {5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3' (Promega Corp., WI, USA)}을 T4 polynucleotide kinase (GIBCO, NY, USA)를 이용하여 동위원소 표지자인 [32 P] dATP (Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 표지하였다. Bio-Rad사의 정제 컬럼(Quick spin column; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 결합되지 않은 [32 P] dATP를 정제한 뒤 말단에 [32 P] dATP가 표지된 프루브를 버퍼에 수집하였다. 32 P-dATP가 표지된 프루브를 만들어 추출된 핵단백질(5 μ g)을 0.02 μ g/L poly (dI-dC) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), 20 mM HEPES (pH 7.9), 4 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol과 4% glycerol이 포함된 5 μ L의 용액에서 섞은 후 실온에서 20~30분간 배양하여 6% polyacrylamide gel과 0.25X Tris-borate EDTA (TBE) buffer에서 30 mV로 3~4시간 전기영동을 하였다.

전기영동 후에는 겔을 80°C에서 건조시켜 암실 -70°C 조건에서 6~18시간 동안 방사선 필름에 노출시켰다. NF- κ B의 구성을 확인하기 위해 두 종류의 Rel 단백질 p50과 p65에 대한 래비트의 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 핵 추출물로부터 supershift assay를 시행하였다. 이를 위하여 항p50 또는 항p65 항체 2.5 μ g을 30분간의 배양과 동시에 DNA 프루브와 함께 첨가하였다. DCA (200 μ M)로 자극 30분 후 양성 대조군 세포주와 더불어 NF- κ B의 억제 목적으로 PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate)를 전처리한 후 HT-29 세포주에서 NF- κ B의 활성도를 측정하였다.

6. IL-8 단백질의 정량적 측정

HT-29 세포주가 50~60%의 subconfluency를 유지한 상태에서 DCA 자극 24시간 전에 배지를 교환하며 실험 전에 70% confluency 이상의 단층세포군을 형성한 상태에서 DCA를 농도별(1~200 μ M), 시간별 처리 후에 세포 상층액에서 ELISA를 이용하여 IL-8의 농도를 측정하였다. 96 well polystyrene plate에 mouse anti-human IL-8 monoclonal antibody (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 4 μ g/mL로 희석된 것을 100 μ L씩 넣고 실온에서 16시간 가량 반응

시켰다. PBS용액(0.05% tween-20, pH 7.4)으로 3회 세척 후 1% BSA (PBS) 300 μ L씩을 넣고 실온에서 한 시간 반응시킨 후 standard (31.25~2,000 pg/mL)와 각 조건별 상층액 표본을 100 μ L씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. HRP-streptavidin conjugate (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 1 : 2,000으로 PBS에 희석하여 각 well에 100 μ L씩 넣고 30 분간 반응시킨 후 PBS용액으로 세척하고 ABTS substrate kit (Zymed)를 사용하여 발색하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과의 분석 및 표준곡선은 Softmax 프로그램 (Molecular devices, Garden Grove, CA, USA)을 이용하였다. 또한 DCA 매개 IL-8 발현의 활성화에 미치는 NF- κ B의 역할을 알아보기 위하여 p-50 센스와 안티센스로 트랜스펙션시킨 HT-29 세포주에서 DCA (200 μ M)로 자극하여 24시간 후 IL-8의 농도를 측정하였다. 또한 TUDC를 농도별로 2시간 전처리한 세포주에서 DCA (200 μ M)로 24시간 자극 후 IL-8의 농도를 측정하였다.

7. ODN의 준비와 cationic liposome을 이용한 ODN의 트랜스펙션

단일 쇄의 ODN은 GIBCO (GIBCO BRL)사에 주문하여 제작하였다. ODN은 세포내 핵분해 효소(nuclease)에 의한 분해를 줄이기 위해 phosphorothioate로 변형시켰으며 AS (antisense)-ODN 또는 S(sense)-ODN은 NF- κ B의 subunit인 p-50 mRNA의 ATG 시발 코돈(start codon)에 대한 상보적인 서열로 p50 AS-ODN의 염기서열은 5'-GGA TCA TCT TCT GCC ATT CTG-3'이고 p50 S-ODN의 염기서열은 5-CAG AAT GGC AGA AGA TGA TCC-3'이었다.

AS-ODN과 S-ODN의 트랜스펙션은 cationic liposome인 DOTAP [N-{1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl}-N,N,N trimethyl ammonium methylsulfate] (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) 방법을 이용하였다. 1 mg/mL 농도의 DOTAP 24 μ L, 25 μ M 농도의 ODN 32 μ L, 그리고 HEPES buffered saline (pH 7.4, 20 mM HEPES, 150 mM HCl) 56 μ L를 혼합하여 DOTAP과 ODN의 최종 농도가 각각 15 μ L/mL, 0.5 μ M이 되도록 하며 37°C에서 15분간 처리하였다. 최종 혼합물을 6-well plate내 우태아 혈청과 항생제가 함유된 배지에 2×10^5 /mL씩 분주된 AGS 세포주에 직접 첨가하여 56시간 배양하고 이후 80% 전후의 confluency를 확인하였다. 트립신을 이용하여 세포주를 부유시켜 수거한 뒤 24-well plate에 6×10^5 /mL 농도로 다시 분주하여 ODN의 최종 농도가 0.5 μ M이 되도록 세포에 첨가한 후 16시간 동안 배양하며 70~80%의 confluency를 확인하였다. 이후 항생제 없는 우태아 혈청 첨가 배지로 교환하여 각각 AS-ODN과 S-ODN으로 처리한 세포주에 DCA로 자극 후 NF- κ B의 활성화도와 IL-8의 발현을 분석하였다.

결 과

1. 데옥시콜릭산 투여 후 HT-29 세포의 생존능 변화

데옥시콜릭산 처리 24시간 후 세포의 생존능은 농도 증가에 따른 차이가 있어 저농도인 50~100 μ M에서는 생존능이 증가하였으나 200 μ M 이상에서는 50% 이하로 감소하였고 400 μ M 이상에서는 세포가 거의 생존하지 못하였다 (Fig. 1A). 시간별로는 150~200 μ M의 데옥시콜릭산 처리 후 18시간부터 생존능이 감소하여 72시간까지 지속되었다 (Fig. 1B). 또한 thymidine incorporation을 이용한 세포의 증식능은 고농도의 데옥시콜릭산 투여 8시간 후부터 감소하여 24시간 경과 후에는 현저히 감소하였다(Fig. 1C).

2. 데옥시콜릭산 투여 후 I κ B α 단백질 발현의 변화

NF- κ B와 결합하여 활성도를 조절하는 핵심 단백질 I κ B α 의 발현을 데옥시콜릭산 투여 후 Western blotting으로 확인하였다. 데옥시콜릭산 투여 1시간 후 I κ B α 의 발현은 데옥시콜릭산의 농도가 200 μ M 이상 높아짐에 따라 감소하였으며(Fig. 2A) 또한 200 μ M 투여 후 60분 경과 후부터 I κ B α 의 단백질 발현은 감소함(Fig. 2B)을 확인하여 간접적으로 데옥시콜릭산의 투여 농도와 시간별로 NF- κ B의 활성도가 증가함을 알 수 있었다.

3. 데옥시콜릭산 투여 후 NF- κ B의 활성도 변화

데옥시콜릭산 투여 2시간 후 EMSA를 통한 NF- κ B의 결합 활성도는 300 μ M 투여 후부터 강하게 증가하였으며 (Fig. 3A) 시간별로는 30분 후부터 증가하여 8시간까지 NF- κ B의 결합 활성도 증가가 지속되었다(Fig. 3B).

4. 항산화제 전처리 후 데옥시콜릭산 유도 NF- κ B의 활성도 변화

여러 세포주에서 다양한 자극에 의한 NF- κ B의 활성도를 억제하는 항산화제로 잘 알려진 PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate)와 rebamipide를 전처리한 후 NF- κ B의 활성도 변화를 측정함으로써 데옥시콜릭산 유도에 의한 NF- κ B의 활성화가 항산화제에 의하여 억제되는지를 알아보았다. 데옥시콜릭산 투여 2시간 전에 위 두 약제를 농도별로 전처리한 결과, 두 약제 모두 데옥시콜릭산에 의한 NF- κ B의 활성화를 억제하지 못하여 이 과정이 항산화제에 의하여 매개되는 않음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 또한 데옥시콜릭산에 의하여 활성화된 NF- κ B 밴드의 구성을 확인하기 위해 각각 p50 항체와 p65 항체를 이용하여 supershift assay를 시행한 결과 주로 활성화되는 NF- κ B complex는 p50/p50 homodimer와 p65/50 heterodimer임을 알 수 있었다(Fig. 4B).

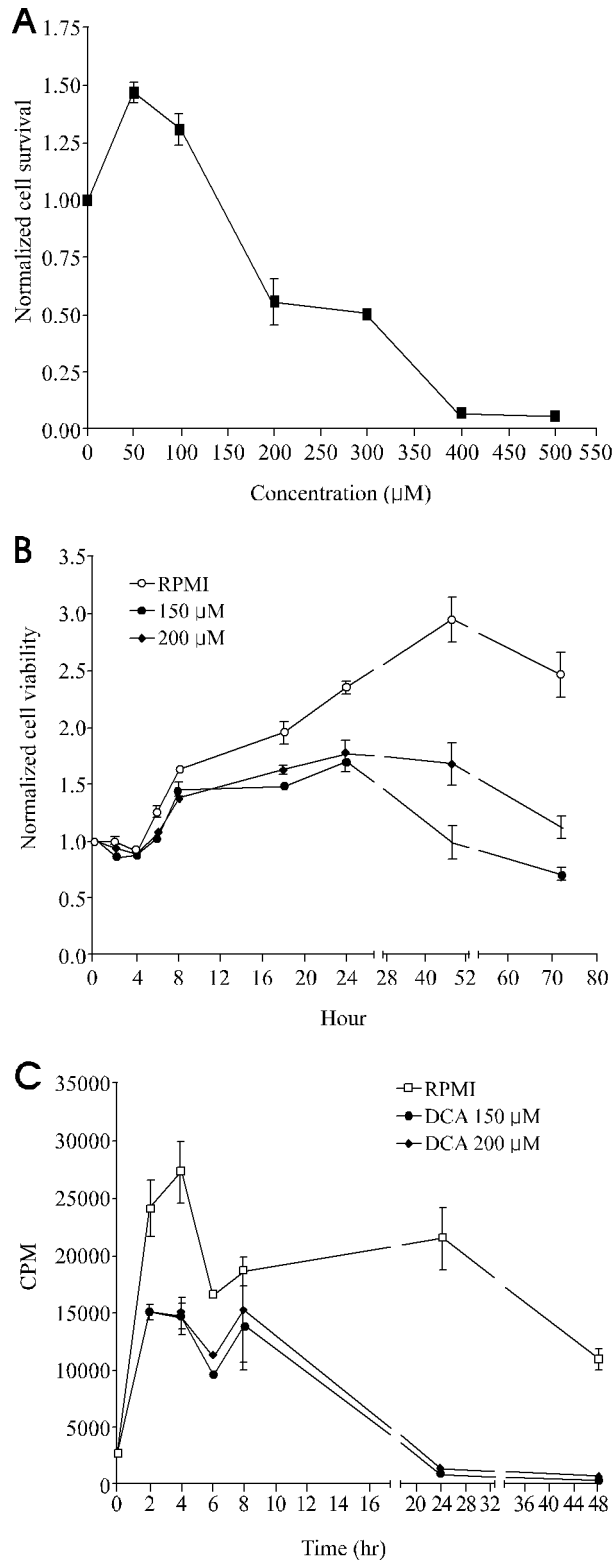


Fig. 1. Effect of DCA on HT-29 cell viability and proliferation. (A) After 24-hour DCA treatment, HT-29 cells viability using MTT assay was decreased dose-dependently. (B) Treatment of DCA resulted in time-dependent suppression of HT-29 cell survival. (C) Thymidine incorporation assay showed that DCA induced a significant decrease of cell proliferation in a time-dependent manner.

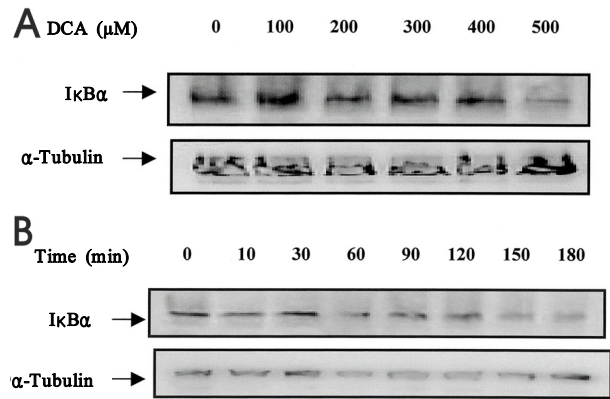


Fig. 2. Concentration and time courses of DCA-induced I κ B α expression in HT-29 cells. (A) Cellular extracts from cells stimulated with DCA for 30 min showed a dose-dependent degradation of I κ B α compared with unstimulated cells. (B) I κ B α expression was significantly down-regulated 60 minutes after DCA treatment (200 μ M). I κ B α expression was assessed by Western blotting.

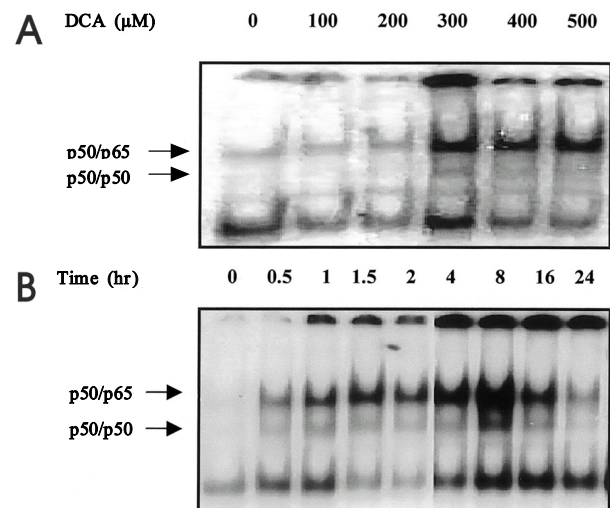


Fig. 3. Changes of NF- κ B binding activity after DCA stimulation. (A) Stimulation with DCA for 60 min showed significant activation of NF- κ B binding activity with the increment of DCA concentrations. (B) NF- κ B binding activity began to rise after 30 min of DCA stimulation, and persisted to 8 hours.

5. 데옥시콜릭산 자극 후 IL-8 단백질 발현의 변화

담즙산에 의한 IL-8 유전자의 발현은 세포고사를 일으키는 강력한 인자로 알려져 있으며, NF- κ B는 IL-8의 promoter에 결합을 함으로써 그 기능을 조절한다. 본 연구 결과 DCA의 처리 후 IL-8의 발현이 농도 및 시간 의존적으로 증가하였다. DCA 처리 8시간 후에 농도 증가(100-500 μ M)에 따라 IL-8의 발현이 증가하였으며(Fig. 5A) 200 μ M의 동일 농도에서 시간 경과에 따라 IL-8의 발현이 증가하였으며 48시간까지 지속되었다(Fig. 5B).

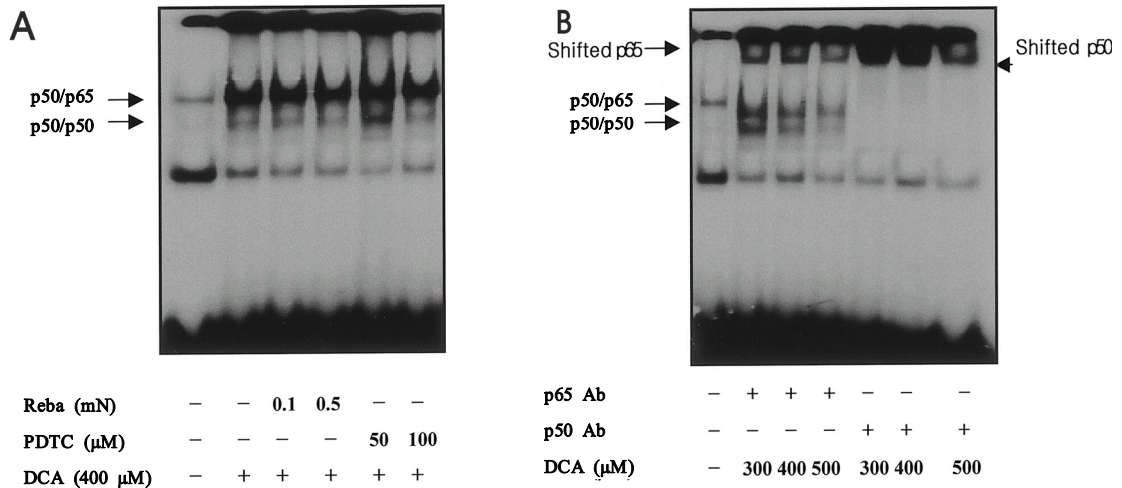


Fig. 4. Effect of NF- κ B inhibitors on DCA-induced NF- κ B activation and supershift assay using p50/p65 antibody after DCA stimulation. (A) Cells were pretreated with rebamipide or PDTC for 2 hours and nuclear extracts were prepared after 60 min of DCA stimulation. Neither rebamipide nor PDTC decreased NF- κ B complex formation. (B) Supershift studies were performed using antibodies directed against two Rel proteins (p50, p65) to determine the Rel protein composition of DCA-induced NF- κ B dimers in nuclear extracts of HT-29 cells treated with DCA (400 μ M) for 60 min. As shown in lane 2 and 3, the upper activated NF- κ B band undergoes a partial supershift with anti-p65 and a nearly complete supershift with anti-p50. Therefore, DCA induced a nuclear translocation of two activated NF- κ B dimers: the classic p50/p65 NF- κ B heterodimer and a p50/p50 homodimer.

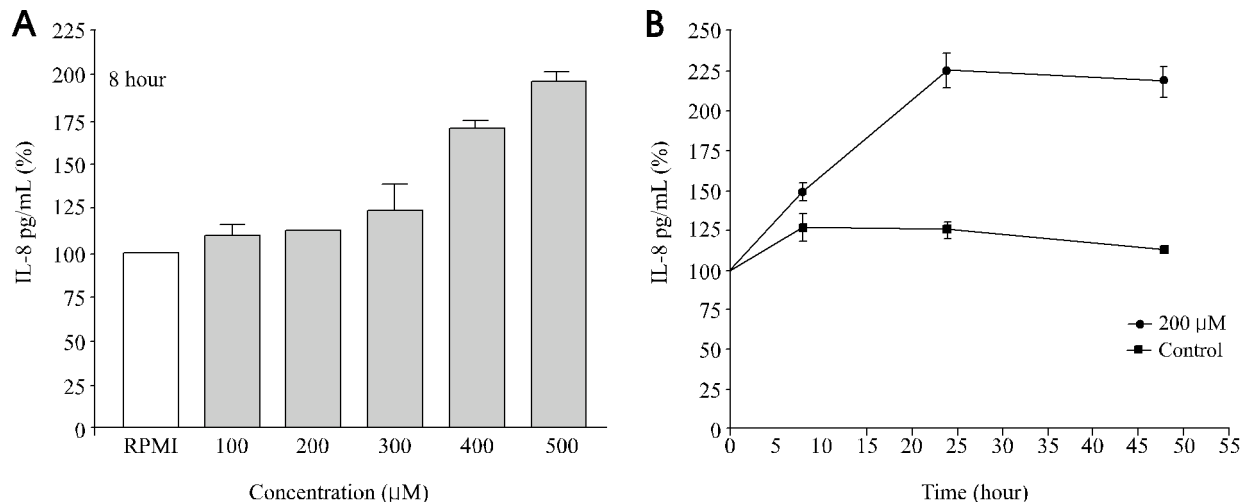


Fig. 5. Concentration and time courses of IL-8 expression in DCA treated HT-29 cells. (A) After 8-hour stimulation with different concentrations of DCA, IL-8 expression was increased in a dose-dependent manner. (B) Stimulation with DCA significantly enhanced IL-8 production in a time-dependent manner also. A statistically significant increase in IL-8 production was evident 8 hour after treatment with high concentration of DCA. Cells were treated in triplicate with or without DCA. Statistical analysis was performed by a two-way analysis of variance and two-tailed Dunnett's test ($P < 0.05$).

6. p50과 p65 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 테옥시콜릭산 자극에 따른 IL-8의 발현

테옥시콜릭산 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF- κ B의 역할을 알아 보기 위하여 NF- κ B의 subunit에 대한 antisense와 sense ODN을 트랜스펙션한 세포주에서 DCA (150 μ M)로 24시간 자극한 후의 IL-8을 측정하였다. p65 subunit에

대한 AS-ODN으로 처리한 세포주에서 DCA 자극 24시간 후 IL-8의 농도는 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 차이가 없었으며 p50 subunit에 대한 AS-ODN으로 처리한 세포주에서는 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 IL-8의 농도가 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다 (Fig. 6).

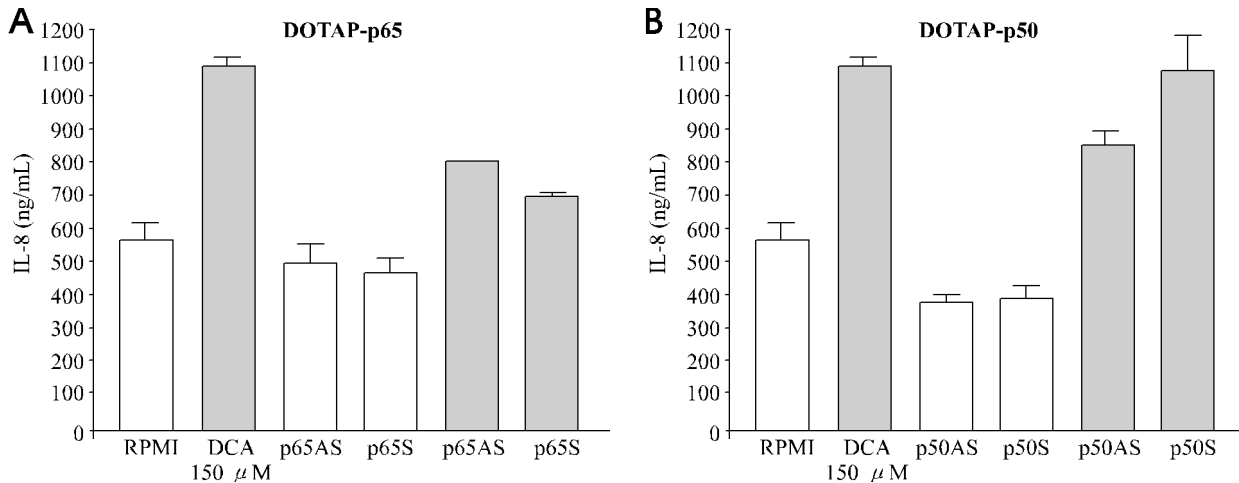


Fig. 6. Effects of NF- κ B inhibitions using AS-ODN for p50 or p65 on DCA induced IL-8 production. Although HT-29 cells transfected with p-50 AS-ODN and stimulated with DCA showed a trend toward inhibition of IL-8 production compared with cells transfected with S-ODN, no significant differences were found between p50 or p65 AS-ODN and S-ODN.

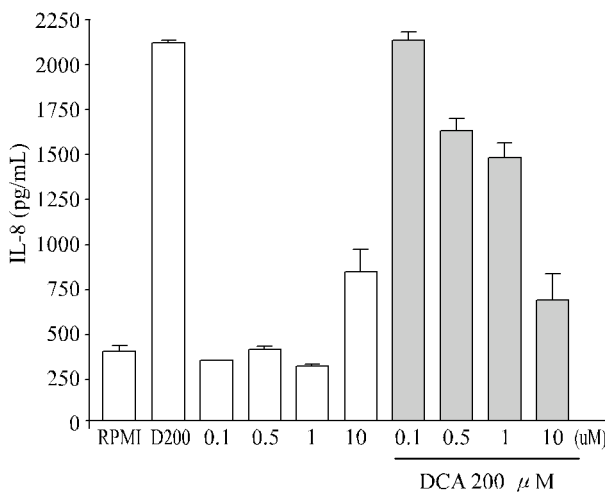


Fig. 7. Effects of TUDC pretreatments on DCA induced IL-8 production. Cells were pretreated with or without TUDC (0.1~10 μ M) for 2 hours. TUDC 0.5 μ M or more significantly inhibited IL-8 production ($p < 0.05$), however, 0.1 μ M showed no significant inhibition of IL-8 secretion.

7. 타우로우르소데옥시콜릭산 전처리 후 데옥시콜릭산 매개 IL-8 발현의 변화

DCA 처리 후 IL-8의 발현 증가에 미치는 타우로데옥시콜릭산(TUDC)의 영향을 알아보기 위해 0.1~10 μ M의 TUDC를 2시간 전처리한 후 IL-8의 농도를 측정하였다. 0.5 μ M 이상의 TUDC는 IL-8의 발현을 통계적으로 의미 있게 억제하였다($P < 0.05$, Fig. 7).

고찰

대장암은 국내에서 최근 발생률이 급격히 증가하여 네 번째로 흔한 암이 되었다. 대장암 중에서 특정 유전자가 암화 과정에 관여하는 가족성 또는 유전성 종양을 제외한 산발성 대장암(sporadic cancer)은 전체 대장암의 70% 이상을 차지하며 유전자 이상과 더불어 산발성 대장암 발생에는 환경 인자가 주된 역할을 할 것으로 생각된다. 특히 식생활의 서구화에 따른 고지방식은 대장암 발생의 주요 환경 위험 인자로 가장 잘 알려져 있으며 국내에서의 대장암 발생 증가와 밀접한 관련이 있다.^{1-3,17,18} 고지방식은 대장 내의 세균 효소인 7 α -dehydroxylase를 통해 탈포합 과정으로 형성되는 DCA의 농도를 증가시켜 대장종양 발생을 촉진한다.⁸

대장암화 과정에서 대장상피세포의 고사나 증식과 관련된 DCA의 하부 신호전달 경로를 규명하려는 많은 연구가 진행되어 왔다. 본 연구에서와 같이 저농도의 DCA는 대장상피세포의 증식을 직접적으로 자극하고, 대장종양세포의 증식을 유도하는 반면,^{19,20} 고농도 (100 μ M 이상)에서는 세포고사를 촉진한다.²¹ DCA에 의한 세포고사 기전으로는 caspase,²² protein kinase C (PKC)의 활성화,²³ 전사 인자 factor activation protein-1 (AP-1)의 발현, ERK 등 MAP kinase의 조절¹⁰이 관여하는 것으로 알려져 있으나 명확한 대장종양의 촉진 기전에 관하여는 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서 DCA에 의한 대장 상피세포주의 신호전달 경로로 확인하고자 하는 NF- κ B는 p50 (NF- κ B1), p52, p65 (Rel A), c-Rel 또는 Rel-B 등의 이합체 조합으로 구성되는 전사 조절 단백질이다. NF- κ B는 다양한 자극에 의하여 세포질 내에서 활성화되어 세포의 자극을 핵 내로 전달하며 세포주의 종류와 자극 물질에 따라 세포의 생존 또는 사멸에 특이적으로 관여하여 면역반응이나 염증반응을 조절한다.²⁴ 휴지기 상태에서의 NF- κ B는 I κ B와 비공유결합 상태로 있

다가 외부 자극이 있으면 I κ B 단백질의 두 군데 serine 잔기가 인산화되어 분리됨으로써 NF- κ B가 떨어져서 핵 내로 들어가 목표 유전자의 DNA 목표 부위에 결합하여 여러 목표 유전자 기능을 조절한다.²⁵ NF- κ B의 내인성 억제제로 알려진 I κ B는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105, p100 등이 있으며, 본 실험에서 발현 정도를 알아본 I κ B α 는 I κ B 중 가장 잘 규명되어 있는 NF- κ B의 활성화 조절 인자이다.²⁵ 본 실험에서 알아보고자 한 NF- κ B의 활성화 변화는 최근 담즙산으로 인한 세포고사 과정에서의 기능이 일부 밝혀지고 있다. 특히 대장암 발생의 억제 효과가 알려진 butyrate는 대장암 세포고사를 억제하는 NF- κ B의 활성을 감소시켜 TNF- α 매개 세포고사를 촉진시켜²⁶ 대장암화 과정에서 NF- κ B의 활성화 증가는 항고사 기전과 관련이 있음을 알 수 있다. 실제 NF- κ B는 대장암 조직과 대장선종의 기질에서 발현이 증가하며 NF- κ B의 억제제는 항암제의 항암 효과를 증강시킨다는 연구 결과는 이러한 사실을 뒷받침한다.^{11,12} 또한 본 실험에서 알아보고자 한 IL-8은 최근 *in vitro*와 *in vivo*에서 혈관내피세포의 증식을 유도하는 잠재적인 혈관생성 인자로 보고되어²⁷ 다양한 인체 암 세포주나 고형암에서^{28,29} 혈관생성과 전이를 촉진한다. 이러한 IL-8의 유전자 발현에는 NF- κ B나 AP-1 등의 전사 활성화 인자가 핵심적인 역할을 하며 NF- κ B의 결합 부위는 IL-8 유전자의 전구체 부위에 존재하여 염증의 조절과 관련된 세포고사를 유도하는 데 관여한다.³⁰ 특히 대장암의 전이와 관련된 IL-8 발현의 변화에 관련된 연구 결과^{13,28}를 근거로 본 연구에서는 대장암화 과정에서 DCA의 종양 촉진 기전에 NF- κ B와 IL-8이 대장상피세포의 신호전달 경로로서 작용하는지 규명하고자 하였다.

본 연구 결과 DCA의 농도 및 자극 후 시간이 경과함에 따라 NF- κ B와 결합하는 I κ B α 의 발현이 감소되어 200 μ M 이상이고 1시간 경과 후부터 I κ B α 의 파괴가 증가함을 알 수 있었다. 동시에 EMSA 실험 결과 NF- κ B의 활성화는 30 분 후부터 증가하기 시작하여 8시간이 경과할 때까지 활성화도가 증가하였다. 특히 NF- κ B의 여러 이합체 중에서 p50/p50 homo-dimer와 p50/p65 hetero-dimer가 활성화됨을 알 수 있었다. 따라서 DCA는 세포질 내에서 I κ B α 의 degradation을 촉진시키고 이차적으로 NF- κ B를 활성화시키며 NF- κ B의 여러 이합체 중에서도 p50/p50 homo-dimer와 p50/p65 hetero-dimer를 활성화시킴을 알 수 있었다. 따라서 이전 연구에서 대장암 세포에서 NF- κ B의 활성화는 세포고사에 저항성을 나타냄³¹을 의미하므로 본 실험 결과는 DCA는 자극 초기에 I κ B α 의 degradation과 NF- κ B의 활성화를 통하여 세포고사에 저항을 유도함을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 hydroxyl radical의 소거제(scavenger)이면서 oxygen radical의 생성을 억제하는 것으로 알려진 rebamipide³²와 산소자유기

소거체로서 hydrogen peroxide에 의해 활성화된 NF- κ B의 활성화를 억제하는 약물인 PDTC³³를 전처리하여 NF- κ B 활성화의 억제 여부를 알아봄으로써 상위 단계 과정에 산소반응기의 역할을 보고자 하였다. 실험 결과, DCA에 의해서 활성화된 NF- κ B는 위 두 물질의 전처리로 억제되지 않아 DCA에 의한 NF- κ B의 활성화는 상위 경로에 반응성 산소가 관여하지 않음을 간접적으로 알 수 있었다.

본 연구 결과 DCA에 의한 IL-8의 발현은 농도 및 시간 의존적으로 증가하여 48시간까지 지속되었다. 따라서 DCA는 대장암의 혈관형성이나 전이에 있어 중요한 역할을 하는 IL-8의 발현 증가를 통하여 종양 형성을 촉진시킬 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 또한 DCA 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF- κ B의 역할을 알아보기 위하여 각각 p65 및 p50 subunit에 대한 AS-ODN으로 처리한 세포주에서 DCA 자극 24시간 후 IL-8의 농도는 S-ODN로 처리한 세포주에 비하여 차이가 없어 NF- κ B의 활성화는 DCA매개 IL-8 발현의 상위조절에는 관여하지 않음을 알 수 있었다. 한편 UDCA (Ursodeoxycholic acid)는 대장용종 발생 동물모델에서 용종 발생을 억제하여 종양 억제 물질로 알려져 있고 TUDC (tauroursodeoxycholic acid)는 세포 실험을 통하여 G₁ phase에서 세포 주기의 진행을 억제하여 종양 세포의 증식을 억제한다. 최근에 UDCA는 대장암 동물모델에서 ras 돌연변이와 cox-2 발현을 억제함으로써 대장암의 발생을 억제하는 것이 알려졌다³⁴, 대장용종 발생 쥐모델 (APC^{min} mouse)에서 UDCA는 비스테로이드성 항염증 약물인 sulindac과 병용 투여시 용량 의존적인 대장용종 억제 효과를 보였다.³⁵ 또한 실제 대장암의 위험성이 증가하는 원발성 협착성 담관염을 동반하는 궤양성 대장염 환자에서 대장종양을 억제하는 물질로 잘 알려져 있다.³⁶ DCA 처리 후 IL-8의 발현 증가에 미치는 TUDC의 영향을 알아보고자 TUDC를 전처리 한 후 DCA 매개 IL-8 발현의 변화를 본 결과, 0.5 μ M 이상의 TUDC는 IL-8의 발현을 통계적으로 의미 있게 억제하여 TUDC의 대장종양 억제 기전에 IL-8의 발현 억제가 관여함을 추측할 수 있었다.

본 연구를 요약하면 HT-29 세포주에서 DCA는 농도 의존적으로 I κ B α 를 파괴하고 동시에 NF- κ B의 활성도를 증가시켰으며 이러한 현상은 항산화제에 의하여 차단되지 않았다. HT-29 대장암 세포주에서 DCA는 농도 의존적으로 IL-8의 발현을 증가시켰으나 NF- κ B의 subunit인 p50 또는 p65-AS의 트랜스펙션 후 발현이 억제되지 않아 NF- κ B의 상위 조절 경로를 거치지 않음을 알 수 있었다. 또한 DCA 매개 IL-8의 발현 증가는 TUDC에 의하여 억제되었다. 따라서 이는 기존에 대장암 세포주에서 기능이 밝혀진 NF- κ B 항세포고사(anti-apoptosis) 작용과 IL-8의 혈관형성 촉진 작용을 통한 종양 촉진(tumor promotor) 인자로서의 기

능을 할 가능성을 시사하며 향후 동물모델 등을 이용한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

목적: DCA는 대장암 발생의 종양 촉진 인자로 잘 알려져 있으나 종양 촉진 기전은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 HT-29 대장암 세포주를 이용하여 데옥시콜릭산 투여 후 NF- κ B의 활성화 여부와 IL-8 발현의 변화를 알아보고 IL-8의 발현이 전사 조절 인자인 NF- κ B에 의하여 조절되는지를 알아보고자 하였다. 또한 대장암의 화학 예방 약물로 잘 알려진 TUDC가 DCA 매개 IL-8 발현을 차단하는지 알아보고자 하였다. 재료 및 방법: HT-29 대장암 세포주에 DCA를 시간 및 농도별로 처리한 후 EMSA 방법을 이용하여 NF- κ B의 결합 활성도 변화를 측정하였다. 동시에 Western blotting을 이용하여 I κ B α 의 발현 변화를 평가하였다. DCA 매개 NF- κ B의 활성화에 반응성 산소기가 상위 경로에 관여하는지를 평가하고자 rebamipide와 PDTTC를 전처리한 후 NF- κ B의 결합 활성도 변화를 측정하였다. 또한 DCA를 시간 및 농도별로 처리한 후 세포주 상층액에서 ELISA법으로 IL-8의 농도를 측정하였다. 또한 DCA 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF-B의 역할을 알아보기 위하여 각각 p65 및 p50 subunit에 대한 AS-ODN으로 처리한 세포주에서 DCA 자극 24시간 후 IL-8의 농도를 측정하였으며 대장종양의 억제 물질로 알려진 TUDC를 전처리한 후 DCA 매개 IL-8의 발현 변화를 측정하였다. 결과: DCA 자극 후 30분부터 8시간까지 NF- κ B (p50/50과 p65/50)의 결합 활성도가 증가하였으며 동시에 I κ B α 의 발현은 억제되었다. IL-8의 발현은 DCA (50-200 μ M) 자극 후 시간 및 농도(50-200 μ M) 의존적으로 증가하였으며 TUDC의 전처리는 DCA 매개 IL-8의 발현을 의미 있게 억제하였다. 그러나 p50 또는 p65 AS-ODN을 이용한 일시적인 트랜스팩션은 DCA 매개 IL-8의 발현에 영향을 주지 않았다. 결론: DCA는 NF- κ B의 활성화를 통한 항고사 작용과 IL-8의 발현을 통한 혈관형성을 통하여 대장종양을 촉진할 가능성이 있으며 DCA 매개 IL-8의 발현은 대장종양 억제 물질로 알려진 TUDC에 의하여 억제되었다.

색인단어: 데옥시콜릭산, HT-29 대장암 세포주, NF- κ B, Interleukin-8

참고문헌

- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993; 15:499-545.
- Reddy BS, Wynder EL. Large-bowel carcinogenesis: fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1973;50:1437-1442.
- Bayerdorffer E, Mannes GA, Ochsenkuhn T, Dirschedl P, Wiebecke B. Unconjugated secondary bile acids in the serum of patients with colorectal adenomas. *Gut* 1995;36:268-273.
- Almond HR, Vlahcevic ZR, Bell CC Jr, Gregory DH, Swell L. Bile acid pools, kinetics and biliary lipid composition before and after cholecystectomy. *N Engl J Med* 1973;289: 1213-1216.
- Hori T, Matsumoto K, Sakaitani Y, Sato M, Morotomi M. Effect of dietary deoxycholic acid and cholesterol on fecal steroid concentration and its impact on the colonic crypt cell proliferation in azoxymethane-treated rats. *Cancer Lett* 1998; 124:79-84.
- Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH, Wynder EL. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:1093-1097.
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:1811-1816.
- Morvay K, Szentleki K, Torok G, Pinter A, Borzsonyi M. Effect of change of fecal bile acid excretion achieved by operative procedures on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1989;32:860-863.
- Payne CM, Crowley C, Washo-Stultz D, et al. The stress-response proteins poly (ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 1998;5:623-636.
- Qiao D, Chen W, Stratagoules ED, Martinez JD. Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 2000;275:15090-15098.
- Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene* 2001;20:819-827.
- Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001;130:363-369.
- Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001;7:3298-3304.
- Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of

1. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993;

- interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994;29:423-429.
15. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Angl Biochem* 1976;72: 248-254.
 16. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6419.
 17. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, Aries V, Crowther JS, Williams RE. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1971;16:95-100.
 18. Willett WC, Stamper MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;323:1664-1672.
 19. Bartram HP, Scheppach W, Schmid H, et al. Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH. *Cancer Res* 1993;53:3283-3288.
 20. Milovic V, Teller IC, Faust D, Caspary WF, Stein J. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. *Eur J Clin Invest* 2002;32:29-34.
 21. Garewal H, Bernstein H, Bernstein C, Sampliner R, Payne C. Reduced bile acid-induced apoptosis in "normal" colorectal mucosa: a potential biological marker for cancer risk. *Cancer Res* 1996;56:1480-1483.
 22. Schlottman K, Wachs FP, Krieg RC, Kullmann F, Scholmerich J, Rogler G. Characterization of bile salt-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;60:4270-4276.
 23. Rao YP, Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Sando JJ, Hylemon PB. Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acid structure and diacylglycerol formation. *J Lipid Res* 1997;38:2446-2454.
 24. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M55-M62.
 25. Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 1996;13: 1367-1378.
 26. Luhrs H, Kudlich T, Neumann M, et al. Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. *Anticancer Res* 2002;22:1561-1568.
 27. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258:1798-1801.
 28. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1994;54:3242-3247.
 29. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994;29:423-429.
 30. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:375-391.
 31. Scaife CL, Kuang J, Wills JC, et al. Nuclear factor kappaB inhibitors induce adhesion-dependent colon cancer apoptosis: implications for metastasis. *Cancer Res* 2002;62:6870-6878.
 32. Naito Y, Yoshikawa T, Tanigawa T, et al. Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study. *Free Radic Biol Med* 1995;18: 117-123.
 33. Ziegler-Heitbrock HW, Sternsdorf T, Liese J, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappaB mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol* 1993;151:6986-6993.
 34. Khare S, Cerda S, Wali RK, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits Ras mutations, wild-type Ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res* 2003;63: 3517-3523.
 35. Russell FJ, Carolyn EC, Ernest TH, Ronald AL. Ursodeoxycholate plus low dose sulindac is an effective and well tolerated chemopreventive agent combination in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2002;122(abstr):234A.
 36. Pardi DS, Loftus EV Jr, Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2003;124:889-893.